

様式第 1 1 号

論文内容要旨

Engineering a human IgG2 antibody stable at low pH

学位申請者氏名：斎藤誠嗣

紹介教員：川崎ナナ教授

1. 序

現在、80 を超えるモノクローナル抗体が癌、慢性疾患、自己免疫疾患を対象とした治療薬剤として上市され、550 を超えるモノクローナル抗体の臨床試験が実施されている。ヒト IgG には 4 つのサブクラス*(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)が存在し、サブクラスごとに異なる性質を有する(図 1)。抗体医薬の開発においてサブクラスの選択は、エフェクター活性*が必要な否かなどを踏まえ、慎重に行われる。一般的に、IgG 抗体のエフェクター活性である ADCC(抗体依存性細胞障害)および CDC(補体依存性細胞障害)の強さはサブクラス間で異なることが報告されている¹。IgG2 は、IgG4 と共に ADCC、CDC が低く、単に中和活性のみが必要な場合や、エフェクター活性を必要としない治療用抗体として理想的なサブクラスの抗体である¹。また、IgG2 抗体は、異なる S-S 結合アイソフォーム(IgG2A、IgG2B、IgG2A/B)が存在し、それらが異なる活性(アゴニスト活性など)を有することが知られるユニークなサブクラスとしても報告されている²。

治療用抗体として開発する上で重要な要素の一つとしてアグリゲーション低減がある。アグリゲーションは発現、精製、製剤化、保存時の各製造プロセスで生じるが、活性低下や免疫原性を亢進する可能性が報告されている³。そこで、抗体医薬品のバイオプロセスにおいてアグリゲーションを可能な限り低減させることは、活性・安全性の観点で非常に重要である。抗体医薬品を精製する際に、プロテイン A を用いて、アフィニティー精製する方法が用いられるが、抗体を溶出するために、低 pH の溶出液が用いられる。また、ウイルス除去のために、一定時間、低 pH ストレス下の処理が広く行われるが、これらステップでアグリゲーションが生じることが報告されている⁴。IgG2 抗体は、IgG1 抗体と比較して、低 pH ストレス下におけるアグリゲーションの生成率が高いことが報告されている⁵。本研究では IgG2 重鎖定常領域を低 pH ストレスに対し安定な IgG1 に置換した各種 IgG2 改変抗体を作製し、低 pH ストレスにおいて安定な IgG2 改変抗体の作製を目指した。

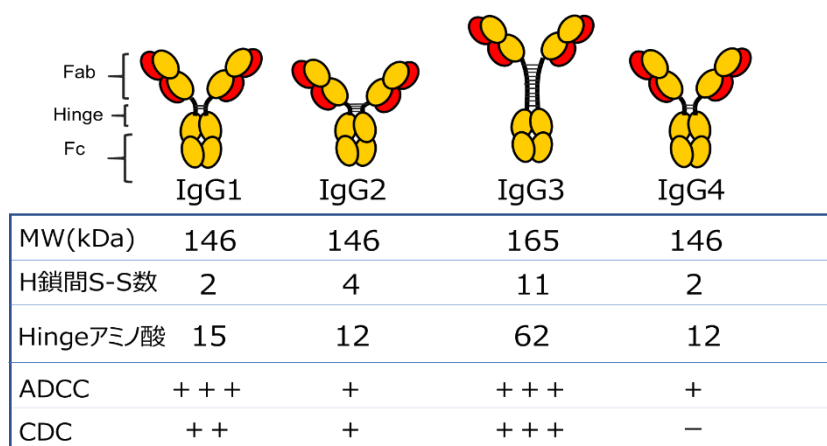


図 1. human IgG サブクラスの構造と特徴

2. 実験方法

1) 各種改変抗体の作製

各種改変抗体は、Expi293F 細胞に発現させ、培養上清から Protein A で精製した。精製抗体は限外ろ過を用いて PBS にバッファー交換し、純度は SDS-PAGE で確認した。

2) 低 pH ストレスアッセイ

各種改変抗体(1 mg/mL)に 0.1 M クエン酸バッファー (pH 2.7)を添加し pH 3.5 に調整した。その後、37 °C で 10、60 min もしくは 25 °C で 60 min、加熱後、0.5M PBS(pH 8.0) を添加して中和し、反応を終了した。低 pH ストレス後のサンプルは SEC 分析を行い、HMWS(High Molecular Weight Species)の含量を測定した(図 2)。

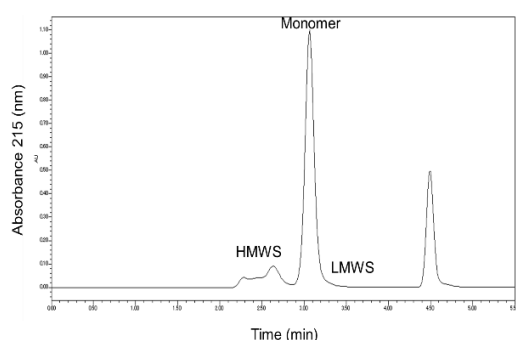


図 2. 代表的な SEC 分析チャート(IgG2 wild type(wt))

3) バイオロジクス活性

各種改変抗体の FcγRIIIa および FcRn へのアフィニティーは Biacore で評価した。抗原および human C1q への結合評価は、ELISA で実施した。

4) 熱安定性解析

各種改変抗体各ドメインの熱安定性は DSC*を用いて評価した。測定は抗体を 0.5 mg/mL IgG (PBS) に調整し、25 °C から 100 °C へ 1°C /min で行った。

3. 研究結果

1) 低 pH ストレスに対し安定な IgG2 抗体の作製

DNP (2,4-Dinitrophenol) に対する DNP-IgG2 抗体*をモデル抗体として使用した。IgG2 抗体の低 pH ストレスアッセイにおいて HMWS 形成に重要な役割を果たすドメインを調べるために、H 鎖の CH1、Hinge、CH2、CH3 ドメインをそれぞれ、IgG サブクラスの中で最も安定な物理化学的性質を有する IgG1 ヘドメイン交換した改変抗体を作製した (IgG1122、IgG2211、IgG2212、IgG2221。数字は IgG サブクラスで、各ドメインの順番は CH1/Hinge/CH2/CH3 に相当する)。次に精製抗体の低 pH ストレスアッセイを実施した (図 3)。

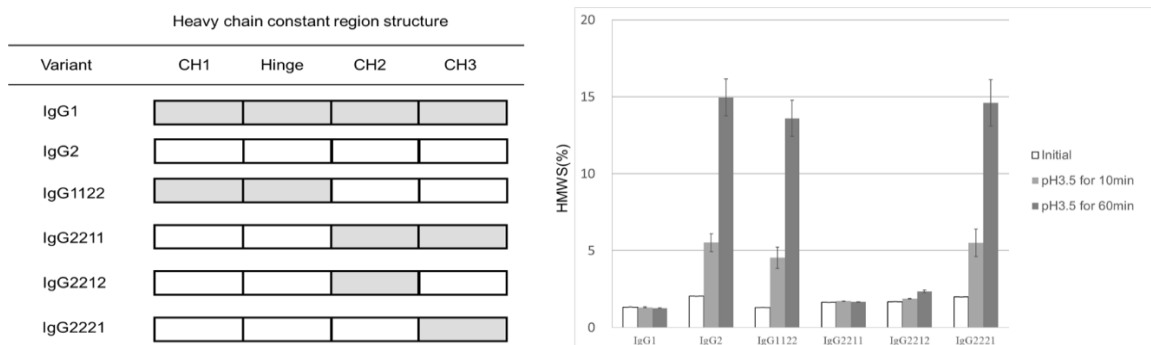


図 3. 作製した各種ドメイン交換抗体及び低 pH ストレスに対する HMWS(%)

CH2 および CH3 を IgG1 に交換した IgG2211 で顕著な HMWS の低減効果が認められた。IgG2212 の解析から、CH2 ドメインが、HMWS 形成低減に最も重要なドメインであることが明らかとなった。次に CH2 ドメインに存在するどのアミノ酸が重要か解析した。IgG1 と IgG2 の CH2 ドメインアミノ酸アライメント解析から 6 個の異なるアミノ酸が存在することから(274, 296, 300, 309, 327, 339)、各アミノ酸を IgG1 型の置換した改変 IgG2 抗体を作製した(図 4)。300 番目の Phe(F)を Tyr(Y)に置換した改変抗体 F300Y は、低 pH ストレスアッセイで IgG2wt と比較し、顕著な HMWS 低減が認められた。V309L と T339A も HMWS が減少した。更に F300Y、V309L、T339A の 3 アミノ酸改変体(IgG2_YLA)を作製し、解析した結果、IgG2212 と同等の安定化を示した(図 5 (A))。

DNP 抗体をモデルとして得られた安定化効果の最も高かった 3 アミノ酸改変(IgG2_YLA)による改変を既に上市されている IgG2 型治療抗体である Panitumumab にも適用した。3 アミノ酸変異(IgG2_YLA)の HMWS 形成は、約 5%で安定化効果を確認出来た(図 5 (B))。

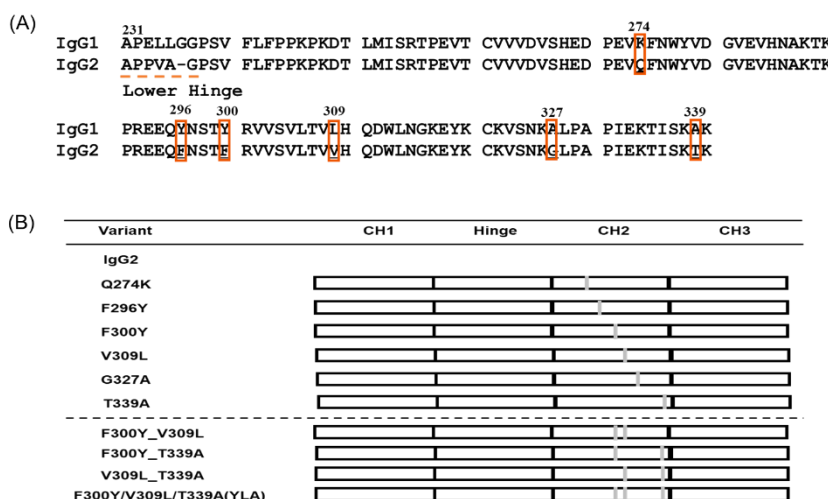


図 4.(A)human IgG1 と human IgG2 の CH2 ドメインアミノ酸配列アラインメント
(B) 作製した各種アミノ酸改変抗体

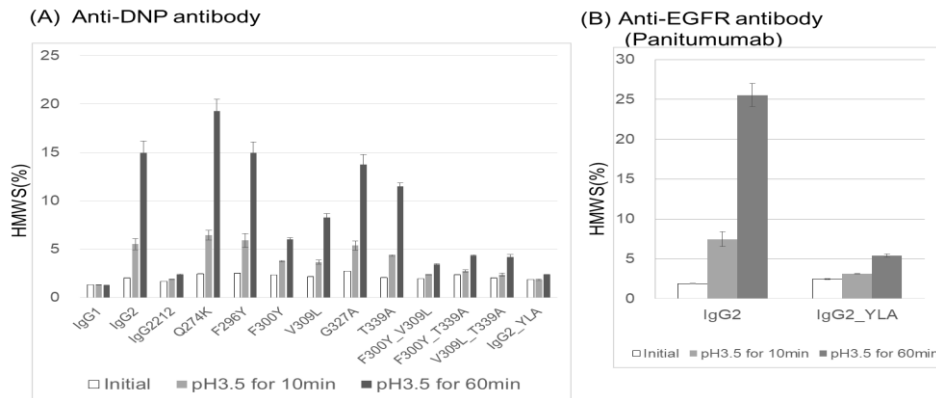


図 5.(A) 各種アミノ酸改変抗 DNP 抗体の低 pH ストレスに対する HMWS(%)
(B) 抗 EGFR 改変抗体の低 pH ストレスに対する HMWS(%)

2) バイオロジクス活性評価

抗原結合活性：IgG2_YLA の DNP に対する抗原結合活性を調べた結果、IgG2wt と同様の結合活性を示した（図 6）。

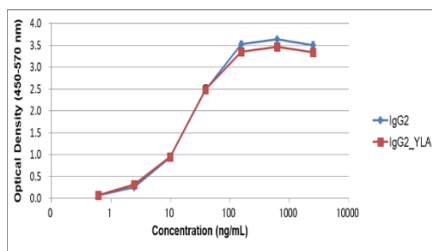


図 6.ELISA による抗原結合活性評価

Fc γ RIIIa/C1q/FcRn 結合評価：ADCC 活性、CDC 活性は、それぞれ Fc γ RIIIa、C1q と抗体 Fc 領域とのアフィニティーが活性と相関することが報告されている^{6, 7}。FcRn も同様に、抗体 Fc 領域とのアフィニティーが血中動態と相関することが報告されている⁸。そこで、IgG2_YLA の Fc γ RIIIa、C1q、FcRn と結合評価を実施した。いずれの評価でも IgG2_YLA は IgG2wt と同等の結合活性を示し、顕著な変化は認められなかった(図 7)。

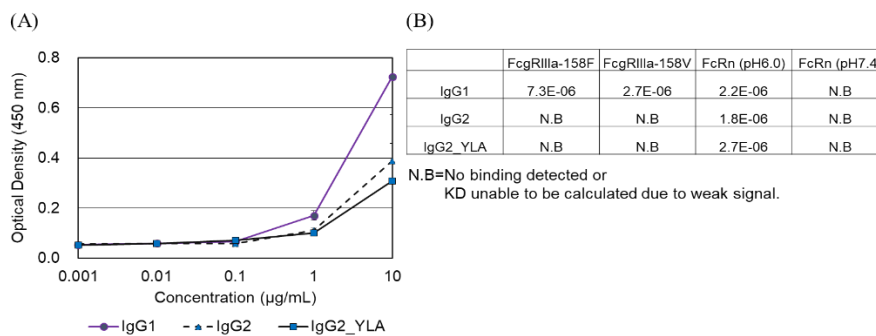


図 7. (A) C1q 結合活性評価 (B)Fc γ RIIIa 及び FcRn へのアフィニティー評価

3) DSC による熱安定性評価

安定化 IgG2_YLA の pH4-7 における熱安定性評価を DSC で実施した。IgG2_YLA の Tm1(CH2)は、いずれの pH でも IgG2wt より高かった。特に低 pH ではその傾向が顕著で、pH6.0 では、IgG2wt と IgG2_YLA の Tm1 の差は 3°C であるの対し、pH4.0 では差が 5°C となり、IgG2_YLA の低 pH におけるコンフォメーション安定化が認められた。

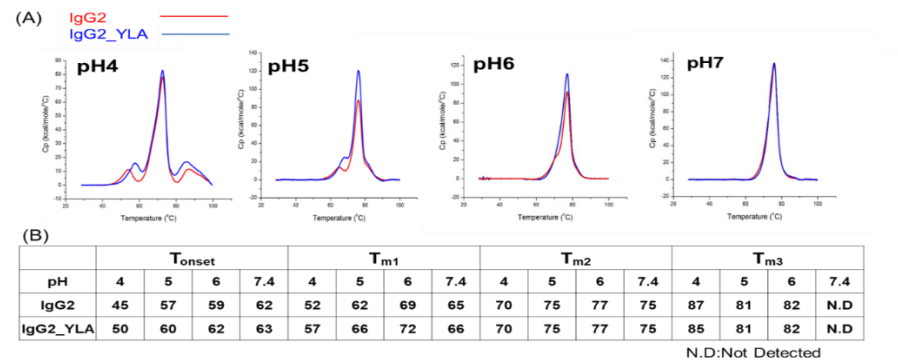


図 8. DSC による熱安定性評価

4. 討論

1) IgG2 改変アミノ酸の低 pH ストレス安定性化メカニズム

DSC を用いた低 pH ストレス安定化の熱安定性評価で、IgG2wt と比較して IgG2_YLA 改変抗体の CH2 ドメインの安定性向上が認められたことから、CH2 ドメインのコンフォメーション安定化が低 pH ストレス安定化に寄与していると考察された。

アミノ酸改変抗体の評価から、IgG2 の CH2 ドメインに存在する F300Y 改変が低 pH に対する安定性を顕著に向上することが明らかとなった。IgG1 の X 線結晶構造解析において、Y300 の側鎖は、pH5 付近では、H268 と E294 は電荷相互作用により CH2 ドメインを安定化することが報告されていることから、F300Y 改変により IgG2 改変体が安定化したと考察される⁵。V309L および T339A の 2 アミノ酸は、CH2-CH3 インターフェイスに存在する。改変による側鎖の違いが、低 pH における CH2 の方向性を変え、IgG2 の低 pH に対する安定性を向上させた可能性が考察される。

CH2 ドメインと比較して、CH3 ドメインを IgG1 型に置換した際の、低 pH ストレスに対する安定性向上は顕著ではなかった。本研究では、Protein A からの溶出やウイルス不活化に必要な pH である pH3.5 のみで低 pH ストレス試験を実施しなかったが、CH3 ドメインの構造変化は、pH 2.5~3.1 の間で生じることが報告されている⁹。即ち、pH が 3.5 より低い pH 条件下では、CH3 ドメイン安定化がより重要になるかも知れない。

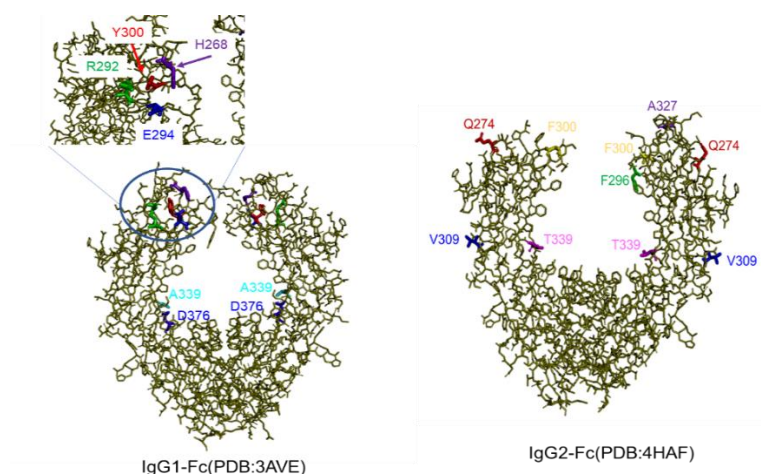


図 9. human IgG1-Fc 及び human IgG2-Fc 構造

2) 活性

IgG2_YLA のバイオリジカル活性を調べた結果、抗原、FcγRIIIa、C1q に対するいずれの結合活性評価において、YLA 変異は、IgG2wt と比較して同等の活性を有していた。

○FcγRIIIa : IgG1-Fc と FcγRIIIa 複合体の構造解析の情報では Y300, L309, A339 いずれのアミノ酸も結合部位としては報告されていない¹⁰。このことが、IgG2_YLA の FcγRIIIa へのアフィニティーを変化させていないと考察する。○C1q : 10 ug/mL の抗体濃度においてのみ IgG2wt と比較して IgG2_YLA は C1q の結合低下が認められた。YLA いずれのアミノ酸も、C1q への結合に直接寄与している報告はないが、IgG1 の Y300 は C1q 結合部位に近接していることから、結合低下に影響を与えたのかも知れない¹¹。○FcRn : IgG1 の L309 は FcRn との結合に重要な位置であることが報告されているが、IgG2wt と比較して IgG2_YLA は、ほぼ同様の KD を示し同様の血中動態を示すことが想定される。しかし、実際の血中動態の把握には更なるデータ取得による検証が必要である。

YLA 改変は、IgG2 のバイオリジクス活性を顕著に変化させず、低 pH ストレスに対する安定化を実現させた。

5. まとめ

- 1) IgG2 の CH2 ドメインを IgG1 型にドメイン変更することで(IgG2212)、低 pH ストレスに対する顕著な安定性向上が認められた。また、CH2 ドメインの内、3 つのアミノ酸改変 (F300Y、V309L、T339A) が安定化に重要なことを明らかとし、3 アミノ酸改変を組み合わせた改変抗体(IgG2_YLA)は、IgG2212 と同等の安定性を示した。
- 2) IgG2_YLA は IgG2wt と同等のバイオリジカル活性(抗原結合活性、FcγRIIIa/ C1q/ FcRn 結合活性)を有し、改変による顕著な変化は認められなかった。
- 3) CH2 ドメインのコンフォメーション安定化が低 pH ストレスに対し重要である。

6. 業績として優れた点（通常の課程博士の学位論文の要件を超える点）

査読付きの原著論文において筆頭著者として 3 報に加え、共著論文 4 報の計 7 報を学術雑誌に発表している。

7. 論文リスト

主論文： **Seiji Saito**, Hiroshi Namisaki, Keiko Hiraishi, Nobuaki Takahashi, Shigeru Iida. Engineering a human IgG2 antibody stable at low pH. *Protein Science* **29**(5):1186-1195 (2020).

参考論文：

- 1) Hiroshi Namisaki, **Seiji Saito**, Keiko Hiraishi, Tomoko Haba, Yoshitaka Tanaka, Hideaki Yoshida, Shigeru Iida, Nobuaki Takahashi. R409K mutation prevents acid-induced aggregation of human IgG4. *PLoS One* **15**: e0229027 (2020).
- 2) **Seiji Saito**, Hiroshi Namisaki, Keiko Hiraishi, Nobuaki Takahashi, Shigeru Iida. A stable engineered human IgG3 antibody with decreased aggregation during antibody expression and low pH stress. *Protein Science* **28**:900-909 (2019).
- 3) **Seiji Saito**, Yano Keiichi, Shweta Sharma, Heather E McMahon, Shunichi Shimasaki. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. *Protein Science* **17**:362-370 (2008).

8. その他（参考文献）

- 1) Salfeld, J. G. Isotype selection in antibody engineering. *Nature biotechnology* **25**, 1369-1372 (2007).
- 2) Dillon, T. M. *et al.* Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass. *The Journal of biological chemistry* **283**, 16206-16215 (2008).
- 3) Moussa, E. M. *et al.* Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci* **105**, 417-430 (2016).
- 4) Ejima, D. *et al.* Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* **66**, 954-962, doi:10.1002/prot.21243 (2007).
- 5) Hari, S. B., Lau, H., Razinkov, V. I., Chen, S. & Latypov, R. F. Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry* **49**, 9328-9338 (2010).
- 6) Idusogie, E. E. *et al.* Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with

- a human IgG1 Fc. *Journal of immunology* **164**, 4178-4184 (2000).
- 7) Koene, H. R. *et al.* Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* **90**, 1109-1114 (1997).
- 8) Ward, E. S., Devanaboyina, S. C. & Ober, R. J. Targeting FcRn for the modulation of antibody dynamics. *Molecular immunology* **67**, 131-141, (2015).
- 9) Latypov, R. F., Hogan, S., Lau, H., Gadgil, H. & Liu, D. Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc. *The Journal of biological chemistry* **287**, 1381-1396, (2012).
- 10) Mizushima, T. *et al.* Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **16**, 1071-1080, (2011).
- 11) Duncan, A. R. & Winter, G. The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738-740, (1988).

9. 用語集

IgG サブクラス

抗体は、Y字型ユニットの数や重鎖の種類に基づき、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の 5 つのクラスに分けられる。IgG は、血中で最も存在量が多く、血清中のすべての抗体の最大 80% を占める。IgG には、ジスルフィド結合の数、ヒンジ領域の長さ、フレキシビリティにおいて異なる 4 種類の IgG のサブクラスが存在する (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。血清中での存在量は、IgG1> IgG2>IgG3>IgG4 の順で、IgG2 は細菌多糖類に対する抗体が多い。

抗 DNP 抗体

2,4-Dinitrophenol(DNP) は有機化合物の一つ。自然界には存在しない人工の化合物であり、標的組織には発現しない。そのため、抗 DNP 抗体は標的抗原に関連した特異的な反応性を持たないことから、*in vitro*、*in vivo* 研究などで、使用抗体の特異性を確認するためのアイソタイプコントロール抗体として使用されることが多い。

エフェクター活性

抗体の Fc 領域が担う機能で、抗体クラスに大きく依存する。特に、IgG クラス抗体が T 細胞、NK 細胞、好中球、マクロファージ上の Fc 受容体を介して、これらのエフェクター細胞を活性化し、抗体の可変領域が結合した標的細胞を殺すことを ADCC (抗体依存性細胞障害)。抗体の可変領域が結合した細胞を溶解させる機能を CDC (補体依存性細胞障害) と言う。

DSC (Differential scanning calorimetry)

示差走査熱量測定。物質の熱容量を測定する熱分析の手法。装置は一般に測定試料と基準物質のホルダーを備えており、測定試料及び基準物質を同時に加熱・冷却させ測定試料と基準物質を温度変化させるのに要した熱量の違いを測定する。試料に発熱・吸熱の現象が起こった場合、融解熱として熱エネルギーが吸収される。一方で液体を冷却しながら結晶化させる場合は、凝固熱として熱エネルギーが放出される。